

黄波罗的愈伤组织培养<sup>1)</sup>

亓磊 詹亚光

(东北林业大学, 哈尔滨, 150040)

**摘要** 通过组织培养技术研究了 NAA、NAA 与 6-BA 组合、培养基类型、培养基 pH 值、蔗糖质量浓度、接种量、培养时间及继代次数对黄波罗愈伤组织生长的影响。结果表明:单独使用 NAA 时,以  $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  愈伤组织生长率最高;NAA 与 6-BA 组合,以  $0.3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  6-BA +  $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  NAA 最好,其生长量明显大于单独使用 NAA 的处理。黄波罗愈伤组织最佳的培养体系为:NT +  $0.3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  6-BA +  $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  NAA,培养基 pH 值为 6.3 左右,蔗糖质量浓度为  $20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ,接种量 0.4 g,继代时间为 20 d,愈伤组织生长量在培养 4 代后达到最大,达 2.14 g 左右。

**关键词** 黄波罗;愈伤组织;继代培养

**分类号** Q813.1

**Callus Culture of *Phellodendron amurense* Rupr./Qi Lei, Zhan Yaguang (Northeast Forestry University, Harbin 150040, P. R. China)//Journal of Northeast Forestry University. -2007,35(9). -14-15,23**

The effects of different concentrations of NAA, combination of NAA and 6-BA, types of culture media, pH of media, carbon sources, inoculating quantity, culture time, and subculture number on callus culture of *Phellodendron amurense* were studied by tissue culture. Results show that  $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  NAA is the best for callus culture when it is used singly. The optimal combination is  $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  NAA +  $0.3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  6-BA when both NAA and 6-BA are used, and the callus yield is significantly higher than that using NAA singly. The best culture system of *P. amurense* is obtained as medium supplemented with NT,  $0.3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  6-BA and  $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  NAA, pH 6.0, carbon sources  $20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ , inoculating quantity 0.4 g, and culture time 20 days. The callus yield up to 2.14 g after the subculture is repeated 4 times.

**Key words** *Phellodendron amurense* Rupr.; Callus; Subculture

黄波罗 (*Phellodendron amurense* Rupr.) 是芸香科黄檗属植物,为我国东北地区三大珍贵阔叶树种之一,材质优良,树皮富含小檗碱、药根碱等多种生物碱成分,是传统中药学珍贵的三大木本药材之一,其是提取小檗碱的重要原材料<sup>[1]</sup>。然而,从天然植株上提取小檗碱受到季节、资源等条件的约束,提取量有限,难以满足市场需求<sup>[2]</sup>。因此,利用植物组织培养技术快速繁殖小檗碱含量高的黄波罗植株,或者通过组培繁殖愈伤组织进行大规模细胞培养生产药用次生产物,具有重要的实践意义。至今,应用组织培养技术生产次生产物的植物已超过百种,一半以上次生产物含量超过原植株<sup>[3]</sup>。该技术在人工控制的条件下改变培养条件,筛选出高次生产物量的优良细胞系,为下一步大规模细胞悬浮培养以及利用生物工程手段改良细胞,生产有用次生产物提供了材料保证<sup>[4]</sup>。但迄今国内对黄波罗愈伤组织培养及其次生产物的研究还未见报道,多数为离体快繁研究<sup>[5]</sup>。笔者旨在通过比较不同的激素组合、培养基类型、培养条件等<sup>[6]</sup>对黄波罗愈伤组织继代培养的影响,筛选黄波罗愈伤组织继代培养最佳的生长条件,为通过细胞悬浮培养进行黄波罗中小檗碱的代谢调控及生产等工作奠定基础。

## 1 材料与方

2005年5月份,采集成年黄波罗枝条,水培。取下休眠芽,经体积分数为3%的次氯酸钠表面消毒后,接于MS培养基上,诱导形成无菌枝条。取茎段作为愈伤组织诱导材料,在MS +  $0.3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  6-BA +  $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  NAA 上诱导的愈伤组织,经 NT +  $0.3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  6-BA +  $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  NAA 培养基

上继代培养一代后,进行愈伤组织继代培养的研究。每个处理接种20瓶,每瓶接种外植体2块。接种量均控制在0.4g左右,培养3周后收获,观察并记录生长情况。

愈伤组织增长量 = 收获量/瓶 - 接种量/瓶;

愈伤组织增长率 = 愈伤组织增长量 × 100/接种量。

培养基中加入蔗糖  $20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ,琼脂  $5.3 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ,添加抗坏血酸  $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ,pH值(酸度计测量)控制在6.0左右。培养温度控制在  $(25 \pm 2)^\circ\text{C}$ ,光照  $12 \text{ h} \cdot \text{d}^{-1}$ ,光照强度  $1000 \sim 1500 \text{ lx}$ 。

## 2 结果与分析

### 2.1 激素对黄波罗愈伤组织培养的影响

#### 2.1.1 NAA对愈伤组织培养的影响

取继代培养一代的新鲜愈伤组织,分别接种到NAA质量浓度为0、0.1、0.5、1.0、2.0、4.0  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  NT培养基上,进行NAA对愈伤组织培养的影响试验。由表1可知,不同质量浓度的NAA对黄波罗愈伤组织继代生长的影响差异较大。低质量浓度NAA的处理,愈伤组织增长量较小;当NAA质量浓度为  $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  时,愈伤组织生长最旺盛,呈浅黄色,表面富有光泽;当NAA质量浓度在  $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  以上时,愈伤组织鲜质量增长量有所下降。培养20d左右,部分愈伤组织出现褐化现象,说明高质量浓度的生长素对愈伤组织生长有一定的抑制作用。

表1 NAA质量浓度对愈伤组织生长的影响

| NAA质量浓度/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ | 愈伤组织增长量(鲜质量)/g | 愈伤组织增长率/% |
|------------------------------------------|----------------|-----------|
| 0                                        | 0.09 ± 0.01    | 25        |
| 0.1                                      | 0.24 ± 0.02    | 63        |
| 0.5                                      | 0.54 ± 0.02    | 134       |
| 1.0                                      | 0.67 ± 0.16    | 170       |
| 2.0                                      | 0.53 ± 0.03    | 147       |
| 4.0                                      | 0.46 ± 0.04    | 113       |

1) 大庆市科学技术计划项目(大庆地区抗旱耐盐绿化树种资源的选择、引种及产业化繁殖技术研究)。

第一作者简介:亓磊,男,1982年6月生,东北林业大学生命科学学院,硕士研究生。

通讯作者:詹亚光,东北林业大学生命科学学院,教授。

收稿日期:2006年11月6日。

责任编辑:张建华。

### 2.1.2 NAA与6-BA交互作用对愈伤组织培养的影响

以NAA最佳质量浓度 $1.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 为基础,分别接种到添加质量浓度为 $0, 0.1, 0.3, 0.5, 1.0, 2.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  6-BA的NT培养基上,进行NAA与6-BA交互作用对愈伤组织培养的影响试验(表2)。另外,进行了单独使用2,4-D及与6-BA组合对愈伤组织继代培养的试验。

表2 NAA与6-BA交互作用对愈伤组织生长的影响

| 6-BA+NAA/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ | 愈伤组织增长量(鲜质量)/g | 愈伤组织增长率/% |
|-----------------------------------------|----------------|-----------|
| 0.0 6-BA+1.0 NAA                        | $0.67\pm 0.16$ | 170       |
| 0.1 6-BA+1.0 NAA                        | $1.35\pm 0.08$ | 323       |
| 0.3 6-BA+1.0 NAA                        | $1.62\pm 0.08$ | 392       |
| 0.5 6-BA+1.0 NAA                        | $1.11\pm 0.07$ | 330       |
| 1.0 6-BA+1.0 NAA                        | $0.85\pm 0.05$ | 278       |
| 2.0 6-BA+1.0 NAA                        | $0.76\pm 0.06$ | 206       |

表2结果表明:激素对黄波罗愈伤组织培养有很大的影响,在没有添加生长素的处理中,愈伤组织生长很差,添加NAA的处理生长较旺盛;6-BA与NAA组合愈伤组织生长量较单独使用NAA的处理大,其中以 $0.3\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  6-BA+ $1.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  NAA组合生长量最大。添加高6-BA的处理,增长量明显减少,说明6-BA质量浓度过高对黄波罗愈伤组织生长不利,但生长量较没有6-BA的处理高,说明6-BA对愈伤组织生长有一定的促进作用。所以6-BA与NAA组合要控制在一定的范围之内。

生长素2,4-D对黄波罗愈伤组织生长有一定的抑制作用,无论浓度变化还是与6-BA组合,只要含有2,4-D的处理,在培养一段时间后,愈伤组织均发生褐化,并逐渐枯死,说明黄波罗愈伤组织不宜使用2,4-D继代培养。黄波罗愈伤组织对不同激素组合的这些反应,说明同一类激素内不同种类间的效应差异和植物物种或品种对激素反应的特异性,进一步说明了激素作用的复杂性<sup>[7]</sup>。

### 2.2 培养基类型对愈伤组织培养的影响

以激素组合 $0.3\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  6-BA+ $1.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  NAA为基础,进行不同培养基类型<sup>[8]</sup>对愈伤组织培养的影响试验(表3),结果表明:NT培养基最有利于黄波罗愈伤组织继代培养,其鲜质量增长量是其他培养基的2~3倍,其次是B5培养基,MS和WPM培养基继代效果最差。在MS培养基上,大多数黄波罗愈伤组织发生褐化现象严重,说明高盐培养基对黄波罗愈伤组织生长不利。

表3 不同培养基对愈伤组织生长的影响

| 培养基类型 | 愈伤组织增长量(鲜质量)/g | 愈伤组织增长率/% |
|-------|----------------|-----------|
| MS    | $0.56\pm 0.04$ | 137       |
| NT    | $1.62\pm 0.08$ | 392       |
| IS    | $0.61\pm 0.05$ | 158       |
| WPM   | $0.55\pm 0.04$ | 138       |
| B5    | $0.81\pm 0.05$ | 200       |

### 2.3 培养基pH值对愈伤组织培养的影响

以NT+ $0.3\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  6-BA+ $1.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  NAA为基本培养基,在培养基可调的pH值范围内进行不同培养基pH值对愈伤组织培养的影响试验,结果表明(表4):不同的pH值对愈伤组织生长影响不同,其中pH值为6.3左右时,愈伤组织富有光泽,生长最旺盛,鲜质量增长量最大;pH值过低,愈伤组织褐化现象严重;pH值过高,愈伤组织逐渐失去光泽,生长缓慢。所以,黄波罗愈伤组织继代培养的培养基pH值宜控制在6.3左右。

### 2.4 培养基蔗糖质量浓度对愈伤组织培养的影响

蔗糖不仅起碳源的作用,而且还具有调节渗透压的作用,对愈伤组织的生长影响显著。以NT+ $0.3\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  6-BA+

$1.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  NAA为基本培养基,进行不同培养基蔗糖质量浓度对愈伤组织培养的影响试验。由表5可知,培养基最适的蔗糖质量浓度为 $20\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ,而当蔗糖质量浓度为 $40\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,鲜质量增长量明显下降,说明高蔗糖质量浓度对愈伤组织生长有一定的抑制作用。

表4 不同培养基pH值对愈伤组织生长的影响

| 培养基pH值 | 愈伤组织增长量(鲜质量)/g | 愈伤组织增长率/% |
|--------|----------------|-----------|
| 5.3    | $0.32\pm 0.07$ | 81        |
| 5.8    | $0.78\pm 0.03$ | 253       |
| 6.3    | $0.88\pm 0.04$ | 261       |
| 6.8    | $0.62\pm 0.14$ | 179       |

表5 培养基蔗糖质量浓度对愈伤组织生长的影响

| 蔗糖质量浓度/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ | 愈伤组织增长量(鲜质量)/g | 愈伤组织增长率/% |
|---------------------------------------|----------------|-----------|
| 10                                    | $1.86\pm 0.04$ | 476       |
| 20                                    | $2.14\pm 0.07$ | 571       |
| 30                                    | $1.84\pm 0.08$ | 512       |
| 40                                    | $1.38\pm 0.09$ | 369       |

### 2.5 接种量对愈伤组织培养的影响

由表6可知:当接种量在 $0.20\sim 0.40\text{ g}$ 范围内,随着接种量的增加,愈伤组织增长量逐渐增大;当接种量到 $0.40\text{ g}$ 时,愈伤组织增长量达到最大;当接种量为 $0.40\text{ g}$ 以上时,愈伤组织增长量与增长率明显下降,说明较大块的愈伤组织更不利于增殖培养。其中,接种量为 $0.20\text{ g}$ 的愈伤组织增长率最高,但是由于接种量较小,愈伤组织容易褐化,对大量继代培养不利,所以,最适的接种量为 $0.40\text{ g}$ 。

表6 不同接种量对愈伤组织生长的影响

| 接种量/g | 愈伤组织增长量(鲜质量)/g | 愈伤组织增长率/% |
|-------|----------------|-----------|
| 0.20  | $0.98\pm 0.03$ | 490       |
| 0.30  | $1.02\pm 0.04$ | 351       |
| 0.35  | $0.99\pm 0.10$ | 287       |
| 0.40  | $1.31\pm 0.05$ | 329       |
| 0.45  | $0.82\pm 0.03$ | 182       |
| 0.50  | $0.88\pm 0.05$ | 165       |

### 2.6 培养时间对愈伤组织培养的影响

取继代第三代愈伤组织接种于NT+ $0.3\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  6-BA+ $1.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  NAA的培养基上培养,每隔4d取一次样,测定愈伤组织鲜质量,做愈伤组织培养的生长曲线(图1)。由图1可知,黄波罗愈伤组织生长曲线大致为S形:0~4d,处于生长延迟期,生长量很低;8~16d,愈伤组织生长明显加快,进入对数生长阶段,生长量为延迟期的10倍以上;20d左右,愈伤组织生长量达到最大,之后逐渐开始下降,所以,愈伤组织最适的继代时间为20d。

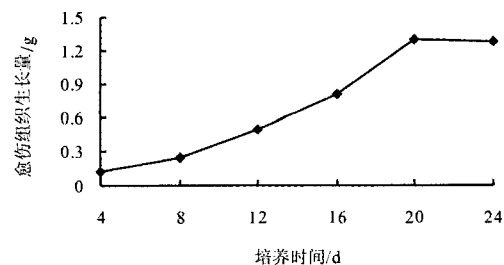


图1 黄波罗愈伤组织生长曲线

### 2.7 继代次数对愈伤组织培养的影响

取黄波罗无菌幼茎诱导出新鲜愈伤组织接(下转23页)

径超过其他混交距离的油松。这个结果说明当混交距离大于等于760 cm时混交对油松的生长有一定的促进作用,发展油松-元宝枫混交是可行的,但混交距离不应小于760 cm。

表8 油松平均胸径与油松、元宝枫距离间关系

| 树种间距/cm | 调查株数 | 平均胸径/cm | 标准差/cm |
|---------|------|---------|--------|
| 100~195 | 4    | 7.65    | 1.10   |
| 200~450 | 6    | 8.23    | 1.42   |
| 450~645 | 7    | 9.26    | 1.30   |
| 650~750 | 7    | 10.10   | 0.75   |
| 760~800 | 6    | 10.50   | 1.28   |

#### 4 结论与讨论

不同混交模式林分生产力、生物量及其分配状况、林分土壤养分分配状况、混交距离对油松生长的影响与不同林分土壤水源涵养能力的试验数据表明:不同模式的油松-元宝枫混交林种间关系具有不同的结构与功能。一方面,油松-元宝枫带状混交林的生产力、生物量及其分配状况均好于油松-元宝枫块状混交林与油松纯林。另一方面,油松-元宝枫块状混交林林下枯落物分解速度较快,积累量明显少于油松-元宝枫带状混交林与油松纯林,从而油松-元宝枫块状混交林具有较好的改良土壤的作用,从而导致油松-元宝枫块状混交林的土壤物理、化学性质及其涵养水源功能好于油松-元宝枫

(上接15页)种于NT+0.3 mg·L<sup>-1</sup>6-BA+1.0 mg·L<sup>-1</sup>NAA的培养基上进行继代培养,试验继代次数对愈伤组织生长的影响(表7)。结果表明,随着继代次数的增多,愈伤组织的生长量逐渐增加,到第4代生长量达到最大,之后生长量逐渐下降。经过几代培养后,愈伤组织质地变得松散,颜色多为浅黄色,这种松散、生长旺盛的愈伤组织适合进行愈伤组织的悬浮培养,所以,进行液体悬浮培养的最佳材料为继代4次的愈伤组织。

表7 继代次数对愈伤组织生长的影响

| 继代次数 | 愈伤组织增长量(鲜质量)/g | 愈伤组织增长率/% |
|------|----------------|-----------|
| 1代   | 0.60±0.07      | 146       |
| 2代   | 1.12±0.05      | 264       |
| 3代   | 1.16±0.10      | 300       |
| 4代   | 2.14±0.07      | 571       |
| 5代   | 1.85±0.05      | 435       |

#### 3 结论与讨论

试验表明,激素对黄波罗愈伤组织继代培养有很大的影响,在没有添加生长素的处理中,愈伤组织生长很差,添加NAA的处理,愈伤组织生长较旺盛。6-BA与NAA组合,愈伤组织生长量较单独使用NAA的处理大,其中以0.3 mg·L<sup>-1</sup>6-BA+1.0 mg·L<sup>-1</sup>NAA组合生长量最大。另外,生长素2,4-D对黄波罗愈伤组织生长有一定的抑制作用,转接一段时间后,愈伤组织褐化现象严重,不宜用于继代培养。

不同培养基的无机元素浓度差异很大,对植物细胞生长和次生代谢产物的形成必然会有较大的影响。试验表明:高盐培养基(MS)培养,愈伤组织褐化现象严重,严重影响细胞增殖,不利于黄波罗愈伤组织继代培养;NT培养基继代培养,愈伤组织的生长率明显高于其他培养基类型,最适合于黄波罗愈伤组织继代培养。

黄波罗愈伤组织继代培养过程中,早期培养褐化现象严重,对其继代生长影响严重。其中,主要的影响因素有:植物

带状混交林。

无论是在地上还是在地下,元宝枫对油松生长都有一定的抑制作用,这种作用随着2个树种混交距离加大而减小,但当油松与元宝枫的距离大于760 cm时,油松生长不受影响,相反对油松生长起到一定的促进作用。混交方式采用块状混交能起到较好的效果。本研究结果可以作为15年生油松-元宝枫混交林健康经营的指导参数。

#### 参 考 文 献

- [1] 汪有奎,袁虹. 祁连山森林健康保护与恢复策略[J]. 北华大学学报:自然科学版,2003,4(2):159-165.
- [2] 陈高,代力民,范竹华,等. 森林生态系统健康及其评估监测[J]. 应用生态学报,2002,13(5):605-610.
- [3] 车克钧,潘爱华. 祁连山水源林可持续经营指标体系的研究[J]. 西北林学院学报,2001,16(增刊):70-73.
- [4] 孙建昌,王进,徐联英. 麻江示范区森林健康现状及健康经营探讨[J]. 贵州林业科技,2002,30(4):34-38.
- [5] 王树森. 华北土石山区基于森林植被演替规律的森林健康研究[D]. 北京林业大学水土保持学院,2005.
- [6] 杨君. 北京八达岭植物群落多样性特征分析[J]. 吉林林业科技,2006,32(2):21-24.
- [7] 木村允. 陆地植物群落的生物量测定法[M]. 姜恕,译. 北京:科学出版社,1981.
- [8] 沈国防,董世仁,袁道平. 油松人工林养分循环的研究 I. 营养元素的含量与分布[J]. 北京林学院学报,1985(4):1-14.

外植体基因型、外植体材料的生理状态、培养基成分(无机盐、细胞分裂素等浓度过高容易发生褐化)、继代时间过长、转接过程中操作不当等<sup>[9]</sup>,因此,控制愈伤组织的褐化对下一步愈伤组织液体悬浮培养、次生代谢产物生产有很重要的意义。试验表明,在选择合适的培养成分的基础上,添加1.0 mg·L<sup>-1</sup>还原性物质抗坏血酸,在继代操作过程中尽量减少对愈伤组织的损伤,均可有效地减少黄波罗愈伤组织的褐化现象。

培养条件对愈伤组织生长有较大的影响,说明控制生长条件可以有效地提高愈伤组织分化增殖效率。培养条件不同,愈伤组织的质地、颜色也有较大差异,这些生理生化特征及分化能力有较大差异的愈伤组织,在次生代谢产物含量方面是否存在差异,还需进一步的研究。

#### 参 考 文 献

- [1] 周以良. 黑龙江树木志[M]. 哈尔滨:黑龙江科学技术出版社,1986:376-378.
- [2] Stockigt J, Obitz P, Falkenhagen H, et al. Natural products and enzymes from plant cell culture[J]. Plant Cell, Tissue Organ Culture, 1995,43:97-109.
- [3] 刘春朝,王玉春,欧阳藩. 植物组织培养生产有用次生代谢产物的研究进展[J]. 生物技术通报,1997,5:1-3.
- [4] 唐建军,项田夫,张禄源,等. 植物次生代谢、离体培养条件下次生代谢产物积累及其调控研究进展[J]. 中国野生植物资源,1998,17(4):1-6.
- [5] Azad M A K, Yokota S, Ohkubo T, et al. In vitro regeneration of the medicinal woody plant *Phellodendron amurense*. Rupr. through excised leaves[J]. Plant Cell, Tissue Organ Culture, 2005,80:43-50.
- [6] Rout C R, Samantaray S, Das P. In vitro manipulation and propagation of medicinal plants[J]. Biotechnology Advances, 2000,18:91-120.
- [7] 李琰,王冬梅,崔宏安,等. 不同因子对杜仲愈伤组织继代培养的研究[J]. 西北林学院学报,2004,19(1):61-63.
- [8] 肖尊安. 植物生物技术[M]. 北京:化学工业出版社,2005:21-23.
- [9] 谭文澄,戴策刚. 观赏植物组织培养技术[M]. 北京:中国林业出版社,2001:114.